

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/700602

PCT/JP99/02698

エヌ

24.05.99

JP99/2658

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

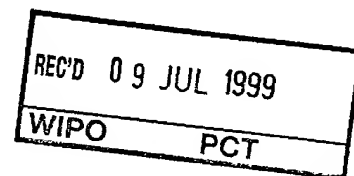
1998年 5月22日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第140722号

出願人
Applicant(s):

岡野 光夫



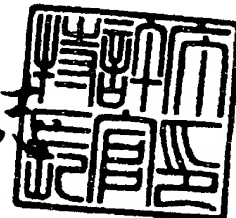
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山佐 建



出証番号 出証特平11-3041123

【書類名】 特許願

【整理番号】 980443

【提出日】 平成10年 5月22日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 G01N 30/00

【発明の名称】 新規な特性を有するクロマトグラフィー用充填剤および
それを用いた物質の分離方法

【請求項の数】 14

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県市川市国府台 6-12-12

【氏名】 岡野 光夫

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区百人町 3-26-1-401

【氏名】 菊池 明彦

【発明者】

【住所又は居所】 東京都杉並区永福 3-17-6

【氏名】 桜井 靖久

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市上鶴間 3451-1-201

【氏名】 金澤 秀子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区池田 2-3-21

【氏名】 松島 美一

【特許出願人】

【識別番号】 593064630

【氏名又は名称】 岡野 光夫

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2番 1号 新大手町ビル 2

06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

特平 1 0 - 1 4 0 7 2 2

【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な特性を有するクロマトグラフィー用充填剤およびそれを用いた物質の分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 移動相を水系に固定したままで、固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させることが可能である、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含む充填剤を用いてクロマトグラフィーによる分離を行うことを特徴とする物質の分離方法。

【請求項 2】 物理刺激が温度変化である請求項 1 記載の分離方法。

【請求項 3】 充填剤が、担体表面に温度応答性高分子で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項 2 記載の分離方法。

【請求項 4】 充填剤が、ラジカル重合法を用いて温度応答性高分子で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項 3 記載の分離方法。

【請求項 5】 温度応答性高分子が、担体表面を側鎖あるいは末端にアミノ基、カルボキシル基、あるいは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの重合体および共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項 3 または 4 記載の分離方法。

【請求項 6】 ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N-プロピルアクリルアミド）、ポリジエチルアクリルアミドまたはポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種である請求項 5 記載の分離方法。

【請求項 7】 物質が金属元素、医薬品、および生体成分から選択される請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項記載の分離方法。

【請求項 8】 アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に物質を保持させた後、外部温度を段階的に変化させる温度グラデーション法により固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させ、同一の移動相を通過させることによって物質を分離することを特徴とする物質の分離方法。

【請求項 9】 移動相が水系溶媒である請求項 8 記載の分離方法。

【請求項 10】 ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N-プロピルアクリルアミド）、ポリジエチルアクリルアミドまたはポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種である請求項 8 または 9 のいずれか 1 項記載の分離方法。

【請求項 11】 物質が金属元素、医薬品、および生体成分から選択される請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項記載の分離方法。

【請求項 12】 固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させることが可能である、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含むクロマトグラフィー用充填剤。

【請求項 13】 重合体あるいは共重合体がアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの共重合体である請求項 12 記載のクロマトグラフィー用充填剤。

【請求項 14】 ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N-プロピルアクリルアミド）、ポリジエチルアクリルアミドまたはポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種である請求項 12 または 13 記載のクロマトグラフィー用充填剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、水系で固定相表面の有効荷電密度あるいは親水性／疎水性のバランスを外的信号（例えば、温度）によって変化させることが可能である、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含む充填剤およびそれをを用いて金属元素、医薬品、および生体成分などの物質をクロマトグラフィーにより分離する物質の新規な分離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

液体クロマトグラフィーは固定相と移動相との組み合わせや分離にあずかる相互作用の様式により多種多様である。液体クロマトグラフィーは金属元素の分離

、医薬品の分離精製、生化学分野のペプチドや蛋白質、核酸などの分離に重要である。さらには最近進歩の著しい遺伝子工学手法により生産される組換え蛋白質などのバイオ医薬への応用が盛んになるにつれ、これらの分離精製のための効率的な分離法の要求がさらに強まりつつある。現在広く用いられているクロマトグラフィーとして、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等がある。

【0003】

イオン交換クロマトグラフィーは不溶性保持担体表面の電解質を固定相として移動相中に存在する対イオンを可逆的に吸着することにより分離を行う。保持担体にはシリカ、セルロースやデキストラン、スチレンとジビニルベンゼンとの共重合体などが多く用いられている。これら担体にスルホン酸基、四級アンモニウム基などのイオン交換基を導入したものをイオン交換体として市販されている。溶液中の水素イオン濃度に応じて溶質はカチオン、アニオン、両性イオンに解離し、この溶液をイオン交換カラムに流した時担体表面の逆電荷の交換基に溶媒イオンと競合して結合し、溶液とイオン交換体表面の間に一定の割合で分配する。この結合の強さによりカラム内を移動する速度が異なることを利用して分離する。この分配はいくつかの方法により変化させることができる。例えば、移動相中の競合するイオン種の濃度により、変化させることができる。また、溶液の水素イオン濃度を変化させ、担体表面のイオン交換基のイオン化の割合を変化させる。したがって、イオン交換クロマトグラフィーでは移動相のイオン強度や水素イオン濃度を調節して溶質の順序を変化させ分離することが一般的に行われている。

また、逆相クロマトグラフィーでは疎水性の固定相と極性の移動相から成り立っている。溶質はその疎水性度に応じて移動相と固定相との間で分配され分離される。これらの場合にも移動相の溶媒の疎水性度を変化させ移動相と固定相との間の分配を変化させ溶出している。また、移動相の溶媒には有機溶媒を用いるために分離対象になる生体成分の活性を損なう恐れがある。

【0004】

いずれにしてもイオン交換クロマトグラフィーでも、逆相クロマトグラフィー

でも基本的には移動相の溶媒を様々に変化させて溶出分離を行っている。溶出に用いている溶媒の酸や有機溶媒により、目的のサンプルの活性を損なう可能性がある。

また、一つの担体で一つのクロマトグラフィーのモードを採用しているために、それぞれのクロマトグラフィーで分離を行う場合にはそれぞれ別々の操作でクロマトグラフィーを別々に行う必要がある。これらの問題を解決するために1種類の担体でしかも1種類の物理刺激でイオン交換クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを行い得る担体を開発することにより、短時間で効率よい分離が可能となり、従来分離し得ないものも分離可能になる。

また、生体成分には電荷を持たないものや持つものなど多種多様である。一般に、イオン化する化合物は、イオン化していない状態では疎水性充填剤に対して疎水性相互作用によって保持される。しかしイオン化されると疎水性充填剤に対して疎水性相互作用は弱まる。イオン解離性化合物の解離定数に差がある場合の分離は、イオン交換体を用いることによりイオン-イオン相互作用によって容易に行うことができる。

【0005】

一般に、塩基性のタンパク質の分離には弱酸性のイオン交換樹脂が、酸性のタンパク質の分離には弱塩基性のイオン交換樹脂が適していることが知られている。このようにイオン交換性の置換基を導入することにより、イオン-イオン相互作用による分離により、疎水性が同程度で分子量に差がなく疎水性相互作用のみでは分離が困難な化合物およびタンパク質や核酸オリゴマーなどの生体分子などの多くの物質への応用が広がることが期待できる。

しかしながら、1種類の担体でしかも1種類の物理刺激でイオン交換クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを行い得る担体や疎水性が同程度で分子量に差がなく疎水性相互作用のみでは分離が困難な化合物およびタンパク質や核酸オリゴマーなどの生体分子などの多くの物質を効率的に分離することが可能な担体はこれまで存在しなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明者らは上記の課題を解決すべく種々の観点から検討および開発を行った。その結果、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PIPAAm）に正電荷を持つジメチルアミノプロピルアクリルアミド（DMAPAAm）を共重合させることでイオン交換機能をもった新しい充填剤を作製し、これを用いて温度によるコントロールを行えば逆相クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーの双方を行い得ることを見いだした。また、共重合体に電荷を持つものを用いたことでポリマーのLCSTをpHによってもコントロールできることを見いだした。本発明はかかる知見に基づいて完成したものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、移動相を水系に固定したままで、固定相表面の有効荷電密度を外的刺激によって変化させることが可能である、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含む充填剤を用いてクロマトグラフィーによる分離を行うことを特徴とする物質の分離方法に関する。

また、本発明は、アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に物質を保持させた後、外部温度を段階的に変化させる温度グラディエント法により固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させ、同一の移動相を通過させることによって物質を分離することを特徴とする物質の分離方法に関する。

さらに、本発明は、固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させることが可能である、荷電を有する共重合体を含むクロマトグラフィー用充填剤に関する。

【0008】

本発明のクロマトグラフィー用充填剤は、固定相の表面構造を温度などの外的な物理刺激で変化させることにより、担体表面に存在するイオン交換基の荷電状態を可逆的に制御しうる。すなわち、本発明は、単一の水系溶媒である移動相（水系移動相）によって、2つのモード、即ちイオン交換クロマトグラフィーと逆

相クロマトグラフィーを同時に行い得る固定相を提供するものであり、しかもイオン交換クロマトグラフィーのモードにおいては担体表面のイオン交換基の荷電を、逆相クロマトグラフィーでは親水性／疎水性のバランスを自由に制御が可能な担体を提供するものである。なお、ここでいう水系溶媒とは水のみ、あるいは無機塩類を含む水溶液であって、有機溶媒を含まないものを意味する。

本発明は移動相を水系に固定したまま、固定相の表面のイオン交換基周辺の物性や構造を物理刺激により、制御して表面のイオン交換基の電荷を調節することによって分離を行うことを特徴とする分離精製担体を提供するものである。即ち、本発明によれば、外部温度を臨界温度以下ではイオン交換基が担体表面に表出し、分離する生体成分はイオン交換基との相互作用し、イオン交換クロマトグラフィーのモードで分離する。外部温度が臨界温度以上では表面に荷電が弱まり、疎水性が増大し、逆相クロマトグラフィーのモードで分離が可能になる。外部温度により担体表面の親水性／疎水性バランスを可逆的に自由に変化することが可能となる。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の方法における外的な物理信号とは、例えば温度変化である。温度変化により、充填剤表面のイオン交換基周辺の物性や構造を変化させることは、例えば担体表面に温度応答性ポリマーを導入することで達成される。このような充填剤は、例えば、担体表面を、側鎖あるいは末端にアミノ基、カルボキシル基、あるいは水酸基等を有するアルキルアクリルアミド重合体あるいはその共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤が挙げられる。化学修飾した充填剤には、例えばシリカ担体に前記のアルキルアクリルアミド重合体あるいはその共重合体で修飾したものを挙げる事が出来る。また、イオン交換基の導入には前記のアルキルアクリルアミドとアミノ基やカルボキシル基を有するモノマーとの共重合体で化学修飾することで得られる。

【0010】

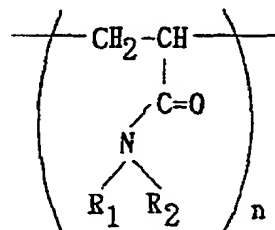
アミノ基を有するポリマーの構成単位としてジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリルアミド、ジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレート、アミノア


ルキル（メタ）アクリレート、アミノスチレン、アミノアルキルスチレン、アミノアルキル（メタ）アクリルアミド、アルキルオキシアルキルトリメチルアンモニウム塩、（メタ）アクリルアミドアルキルトリメチルアンモニウム塩等が挙げられる。また、カルボキシル基を有するポリマーの構成単位としてアクリル酸、メタクリル酸、スルホン酸を有するポリマーの構成単位として（メタ）アクリルアミドアルキルスルホン酸等が挙げられる。

本発明の方法において使用するポリアルキルアクリルアミドとしては、下記に示すポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリジエチルアクリルアミド、ポリ（N-プロピルアクリルアミド）およびポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種、或いはこれらのポリマーの構成単位とアルキルアクリレートもしくはアルキルメタクリレートとの共重合体が望ましい。

【化 1】

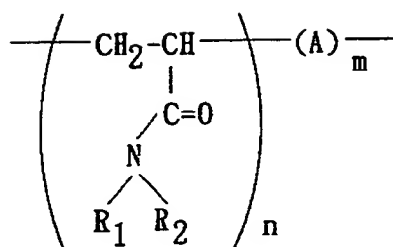
ポリ-アルキルアクリルアミド



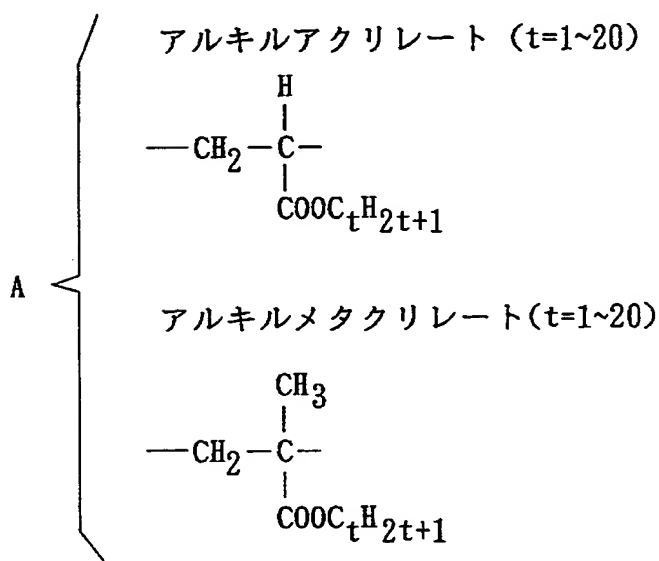
	R ₁	R ₂	略号
ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）	-H	$-\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	ポリ（IPAAm）
ポリ（N,N'-ジエチルアクリルアミド）	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	ポリ（DEAAm）
ポリ（アクリロイルピロリジン）			ポリ（APy）
ポリ（N-プロピルアクリルアミド）	-H	-C ₃ H ₇	ポリ（PAAm）

【化 2】

共重合体



A : 50 ~ 60 % 含有



【0011】

ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) は 32℃ に下限臨界温度を有するので、該分子で化学修飾した担体はこの臨界温度で親水性／疎水性の表面物性を大きく変化させるため、これをクロマトグラフィーの充填剤の表面にグラフトもしくはコーティングして使用した場合、試料に対する保持力が温度によって変化せられる結果溶出液の組成を変化させずに保持挙動を温度によってコントロールすることが可能である。下限臨界温度を 32℃ 以上にするためには、イソプロピルアクリルアミドよりも親水性のモノマーであるアクリルアミド、メタクリル酸、アクリル酸、ジメチルアクリルアミド、ビニルピロリドンなどの親水性のコモノマーを N-イソプロピルアクリルアミドと共重合させることによって調整することが可能である。また、下限臨界温度を 32℃ 以下にしたいときは、疎水性モノマーであるスチレン、アルキルメタクリレート、アルキルアクリレートなどと

の疎水性のコモノマーとの共重合によって調整することができる。

また、ポリジエチルアクリルアミドの下限臨界温度は、約30℃～32℃であり、この温度を境として親水性／疎水性に表面物性が変化し、前述のポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）の場合と同様に、試料に対する保持力を温度によって調整することができる。本発明で利用される新規なクロマトグラフィー用担体は、化学修飾或いは高分子のコーティングによって作製される。化学修飾手段としては表面グラフト法とラジカル重合の2つの方法を用いることができる。またコーティング方法としては、適用温度範囲内で不溶とした後、不溶なものをコーティングする。

【0012】

上記したように、温度応答性高分子を担体へ導入するための化学修飾法は表面グラフト法とラジカル重合法を用いることができる。表面グラフト法は一定の大きさの温度応答性高分子を始めに合成して、担体に接合する方法であるのに対して、ラジカル重合法では担体表面上でモノマーから重合させ高分子を構築する方法である。表面グラフト法に比較し、担体表面に密に温度応答性高分子を導入することが可能である。担体表面の疎水性度を増大させ、保持時間をコントロールしやすくなる。また、担体表面でのシリカゲルとの相互作用による非特異的吸着を抑えることができる。

本発明の分離方法によって分離することができる物質としては、金属元素（例えば、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 等）、医薬品（例えば、ステロイド化合物、解熱鎮痛剤等）、生体成分（例えば、ペプチド、タンパク質、核酸等）等が挙げられる。特に、イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーそれぞれ単独では分離することができない種々の生体成分の分離に有効である。

【0013】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれによって何ら限定されるものではない。

【0014】

【実施例 1】

1. ポリマーの合成

1-1) ポリ (IPAAm-DMA PAAm) (DMA PAAm: N, N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)

1-1-a) カルボキシル末端基を持つ IPAAm 共重合体の作製

カルボキシル末端基を持つ IPAAm 共重合体を分子量 4000 を目安として合成した。ここで共重合体の分子量は、連鎖移動剤である 3-メルカプトプロピオン酸 (MPA) の量によって設定することができる。分子量 4000 の共重合体を作製するには、モル比で $MPA / (IPAAm + DMA PAAm) = 0.028$ となるように MPA の量を調整した。

精製モノマー IPAAm: 25.0 g

カチオン性モノマー IPAAm に対しモル比で DMA PAAm 5%: 1.72 g

ラジカル開始剤 2, 2'-アゾビス (イソブチロニトリル) (AIBN): 0.145 g

連鎖移動剤 (3-メルカプトプロピオン酸) 0.691 g

DMF (N, N-ジメチルホルムアミド) 50 ml

上表にある物質を重合管に入れ、三方活栓を取り付け輪ゴムで固定した。そして、コックを閉じた状態で重合管を液体窒素中に入れ完全に凍結させ、次にコックを開いて真空ポンプを用いて脱気した。次に再びコックを閉じて重合管をメタノール中に入れ管内のサンプルを完全に溶解させた。この操作を 3 回繰り返した (凍結融解脱気法)。このように、充分脱気したサンプルで減圧状態になっている重合管を 70℃ の振とう恒温槽に入れ、2 時間ラジカル重合反応させ片末端にカルボキシル基を持つ共重合体を合成した。反応後、室温になるまで放置し、溶媒 (DMF) を 40℃ で減圧蒸留し濃縮し、残留物を氷冷したジエチルエーテルに滴下しポリマーを得た。得たポリマーを濾取し、常温で一晩減圧乾燥し、その乾燥物をアセトンに溶かし再びジエチルエーテルで精製した。これによって得たポリマーを再び濾取しこれを常温で一晩減圧乾燥した。ここで得たポリマーを 5% (w/v) の溶液になるように精製水にとかした。これを分画分子量 500 の

透析膜に移し3日間透析を行った。これによって、分子量のそろった純度の高い共重合体を得た。

【0015】

1-1-b) IPAAm共重合体の担体への導入

(a) 活性エステル(スクシニル)化法

合成した共重合体をスクシニル化するにあたり、モル比で合成共重合体:N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide(DCC)):N-ヒドロキシスクシンイミド(N-Hydroxysuccinimide)=1:2.5:2の割合になるように調整した。

ナス型コルベンに合成共重合体を入れ、半量の酢酸エチル(25~30mL)で溶かした後N-ヒドロキシスクシンイミドとDCCを加え残りの酢酸エチルを加え溶かした。次に4℃の氷水に浸し2時間スターラーで攪拌し、後に25℃に設定した恒温槽に入れて一晩攪拌した。溶液を濾過し、副生成物であるジシクロヘキシル尿素を取り除き、減圧下で濃縮した。最後にジエチルエーテルで精製し、生成物を濾取・減圧乾燥して得られたスクシニル化共重合体を冷凍庫に保存した。

【0016】

1-1-c) 担体(シリカゲル)への導入

スクシニル化した共重合体を、溶媒に1,4-ジオキサンを用いて、3回に分けてアミノプロピルシリカゲルと反応させた。反応温度は室温(25℃)で行った。まずスクシニル化ポリマー(1.0g)を1,4-ジオキサン(50mL)に溶かし、振とう恒温槽中でアミノプロピルシリカゲル(3g)と一晩反応させた。次に反応液を濾取したものと、新たな共重合体(1.0g)を再び1,4-ジオキサン(50mL)に溶かし一晩反応させた。この操作をもう一度繰り返したり最後に濾取したものを、メタノール(500mL)、蒸留水(2L)で十分洗浄し、これを充填剤として減圧乾燥してデシケーターに保存した。

【0017】

【実施例2】

1-2) PIPAAmハイドロゲル表面の作製

1-2-a) アミノプロピルシリカゲル表面へのゲル層の形成

はじめにアミノプロピルシリカゲルへ重合開始剤を導入するために下記の化合物を使用した。

アミノプロピルシリカゲル 5 g
V-501 3.5 g (12.5 mmol)
EEDQ 6.18 g (25.0 mmol)
DMF 50 ml

上述の量でV-501 [4, 4'-アゾビス(4-シアノバレリン酸(4, 4'-azobis(4-cyanovaleeric acid)) (分子量: 280.28)] を重合開始剤、EEDQ [N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン(N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1, 2-dihydroquinoline) (分子量: 247.30)] を縮合剤として使用し、これらとアミノプロピルシリカゲルをDMF中で反応させた。これを遮光下で30分間N₂(窒素)ガスでバブリングしその後完全にN₂置換し、N₂風船をつけて室温で6時間反応させた。反応後ろ過してからDMFで洗浄した。これにより表面に重合開始剤を導入した。

【0018】

1-2-b) 表面ゲル層の形成

1-2-aで作製したV-501結合シリカゲル 4 g

IPAAm 10 g
BIS 0.27 g
EtOH 200 ml

DMAPAAm IPAAmに対してモル比で8:2あるいは9:1になる量を添加した。

シリカゲル、IPAAm、DMAPAAm、BIS [N, N'-メチレンビス(アクリルアミド) (N, N'-Methylene-bis(acrylamide)) (分子量: 154.17)] をエタノールに溶解させた。これを遮光

下で1時間 N_2 バブリングしその後完全に N_2 置換し、 N_2 風船をつけて70℃（油浴）で5時間反応させた。これによりPIPAAm表面のゲル層を形成した。反応後ろ過したしてからメタノールと水で洗浄した。これを充填剤として減圧乾燥してデシケーターに保存した。これをステンレスカラムに充填して分析に用いた。

【0019】

【実施例3】

正電荷ゲル（IPAAm:DMAPAAm=8:2）とIPAAmハイドロゲルを充填したカラムを用いて、下記の分離条件でアスピリン（Aspirin）、サリチル酸（salicylic acid）、サリチル酸メチル（methyl salicylate）、安息香酸（benzoic acid）を分離した。

分離条件

カラム：（1）ポリ（IPAAm）ハイドロゲル修飾シリカ充填カラム

（2）ポリ（IPAAm-co-DMAPAAm）（8:2）ハイドロゲル修飾シリカ充填カラム

緩衝液： $Na_2CO_3/NaHCO_3$

pH=9.0

イオン強度=0.1M

結果を図1に示す。IPAAmハイドロゲルを充填したカラムではアスピリンと安息香酸が分離出来ないが、正電荷ゲル（IPAAm:DMAPAAm=8:2）を充填したカラムではこれらの化合物の分離が可能となった。特に10℃では荷電性物質および非荷電物質を含む4種すべての分離が20分程度の短時間で可能となった。分離順序はこれらの化合物の疎水性度に依存している。また温度上昇に伴い、保持時間（retention time）がサリチル酸と安息香酸では減少した。これは、温度上昇により温度応答性ポリマーの構造および物性に変化し、担体表面の荷電が減少して表面と溶質との相互作用が減少したことによるものと考えられる。電荷をもたないサリチル酸メチルでは逆に保持時間が上昇している。これは温度上昇により温度応答性ポリマーが疎水性に変化したため

によると考えられる。

【0020】

【実施例4】 pHの変化による影響

実施例3のポリ（IPAAm-co-DMA PAAm）（8：2）ハイドロゲル修飾シリカ充填カラムを用いて、緩衝液として $\text{NaHPO}_4/\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ （クエン酸・ H_2O （一水和物））を用い、 $\text{pH}=7.0$ とした以外は実施例3と同じ方法によりアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した。結果を図2に示す。

図2から、 $\text{pH}9.0$ に比べて $\text{pH}7.0$ ではすべての物質において保持時間が増大したことがわかる。これはアニオン性化合物は $\text{pH}7.0$ でより正荷電を有する担体表面と強く相互作用するためと考えられる。したがって、 pH により分離する物質の保持時間を調節することが可能であることが示された。

【0021】

【実施例5】 イオン強度による影響

実施例3のポリ（IPAAm-co-DMA PAAm）（8：2）ハイドロゲル修飾シリカ充填カラムを用いて、下記の分離条件でアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した。

分離条件

緩衝液： $\text{NaHPO}_4/\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

$\text{pH}=7.0$

イオン強度＝ 1.0M および 0.1M

結果を図3に示す。イオン強度の増大（ $0.1\text{M}\rightarrow 1.0\text{M}$ ）により、電荷をもたないサリチル酸メチルを除くすべてにおいて、保持時間は減少し、サリチル酸メチルでは保持時間が増大した。イオン強度の増大により、担体表面のアミノ基のプロトン化が抑制され、正荷電が減少したために、アニオン性化合物との相互作用が弱くなったためと考えられる。サリチル酸メチルではイオン強度の増大にともなって担体表面の疎水性度が増大し、疎水性相互作用が強くなったためと考えられる。

【0022】

【実施例 6】IPAAm と DMA PA Am の重合比率による影響

下記の分離条件でアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した。

分離条件

カラム：(1) ポリ (IPAAm-co-DMA PA Am) (9:1) ハイドロ
ゲル修飾シリカ充填カラム

(2) ポリ (IPAAm-co-DMA PA Am) (8:2) ハイドロ
ゲル修飾シリカ充填カラム

緩衝液： $\text{NaHPO}_4/\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

pH = 7.0

イオン強度 = 0.1 M

結果を図 4 に示す。正荷電性のポリマーの増大により保持時間は増大した。この結果から、重合比率の変化により保持時間が調整可能であることがわかる。

【0023】

【発明の効果】

本発明は下記に示す利点を有する。

- 1) 担体表面に表出しているイオン交換体の荷電量を温度で自由に調節し、移動相の溶媒を変化させずに、単一の水系の移動相で分離が可能である。
- 2) 一回の操作で溶質の疎水性およびイオン性の違いにより、分離が可能である。2 回の分離操作が 1 回で済み、効率的であり、回収率が向上する。
- 3) イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーそれぞれ単独では分離できない生体成分の分離が可能になる
- 4) 酸や有機溶媒を用いずに分離し、生体成分の活性を損なうことなく分離が可能になる。
- 5) 充填剤の再生が従来のイオン交換体に比べ速やかに行うことが出来る。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 2 に記載された 2 種類の充填剤を用いてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフで

ある。

【図 2】

実施例 3 において pH を変えてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

【図 3】

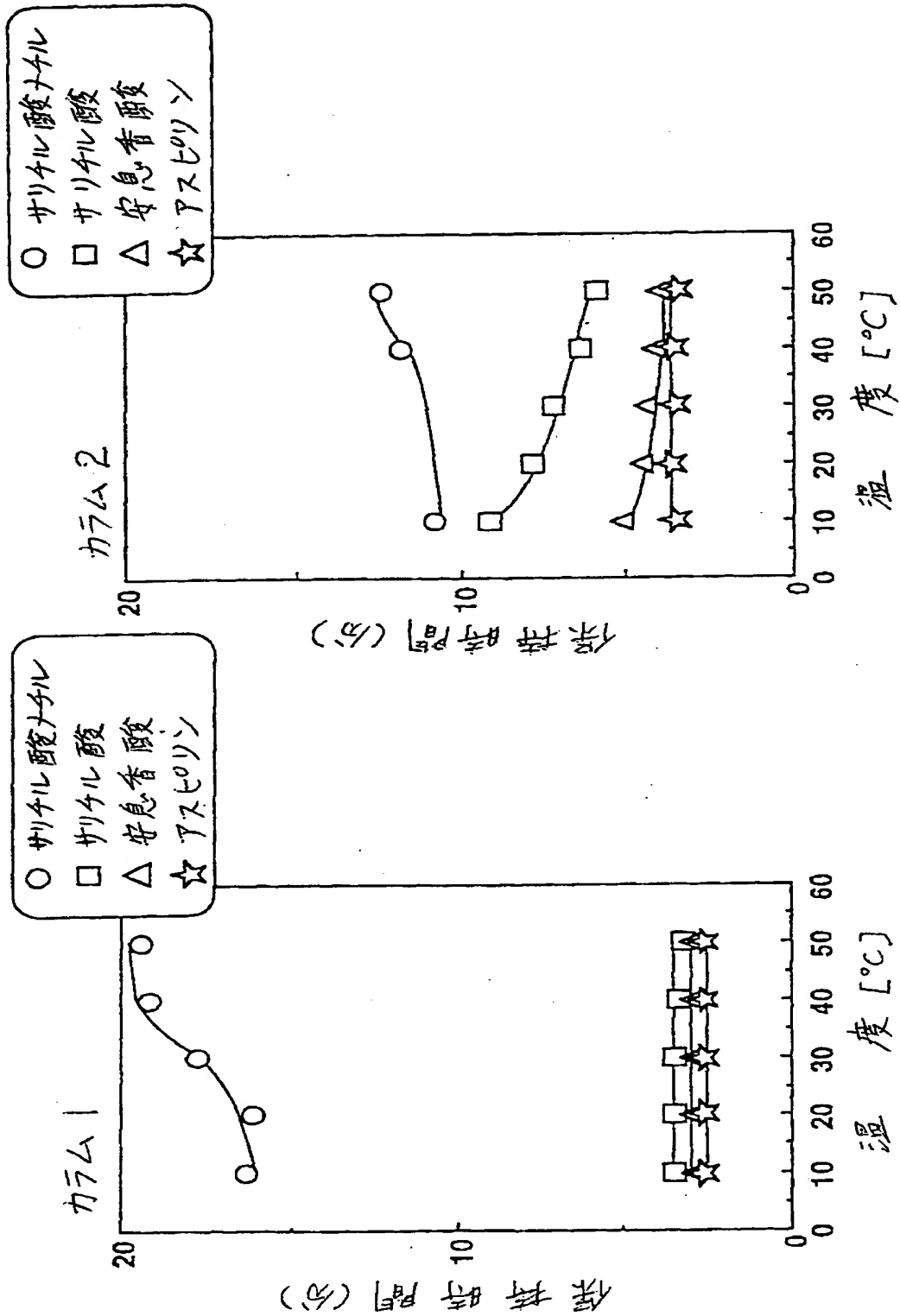
実施例 4 においてイオン強度を変えてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

【図 4】

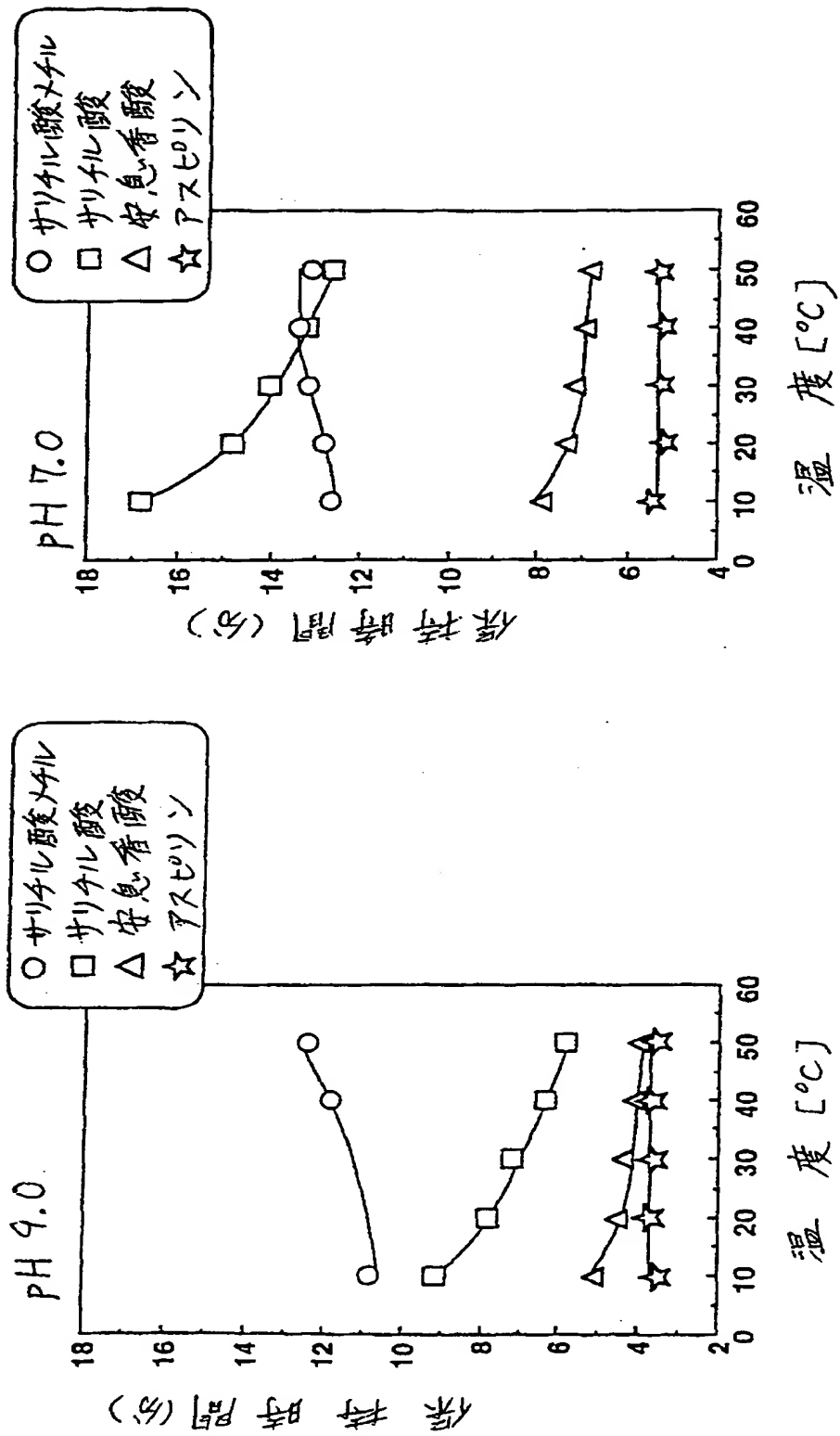
実施例 5 において IPAAm と DMA PAAm の重合比率を変えてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

【書類名】 図面

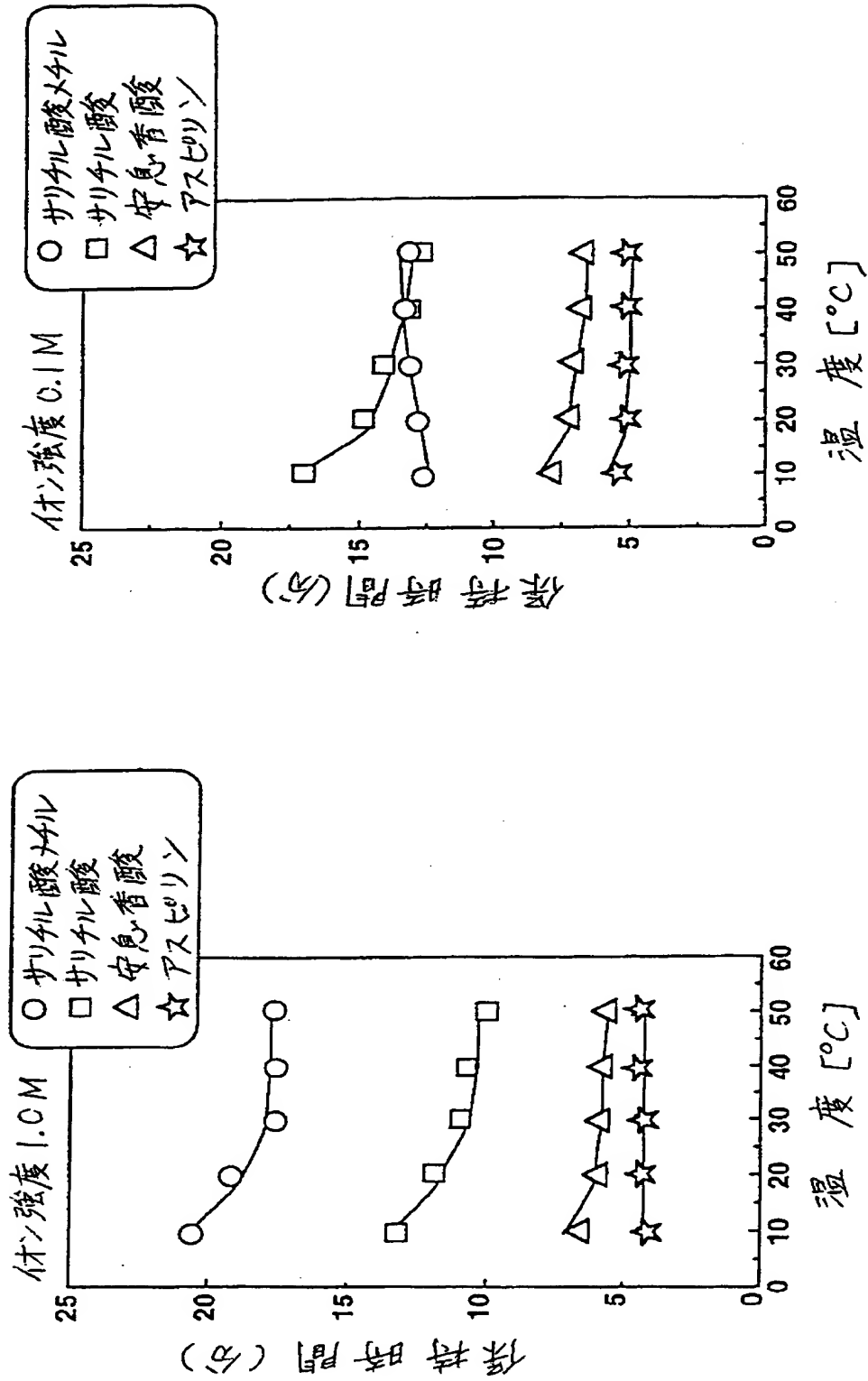
【図1】



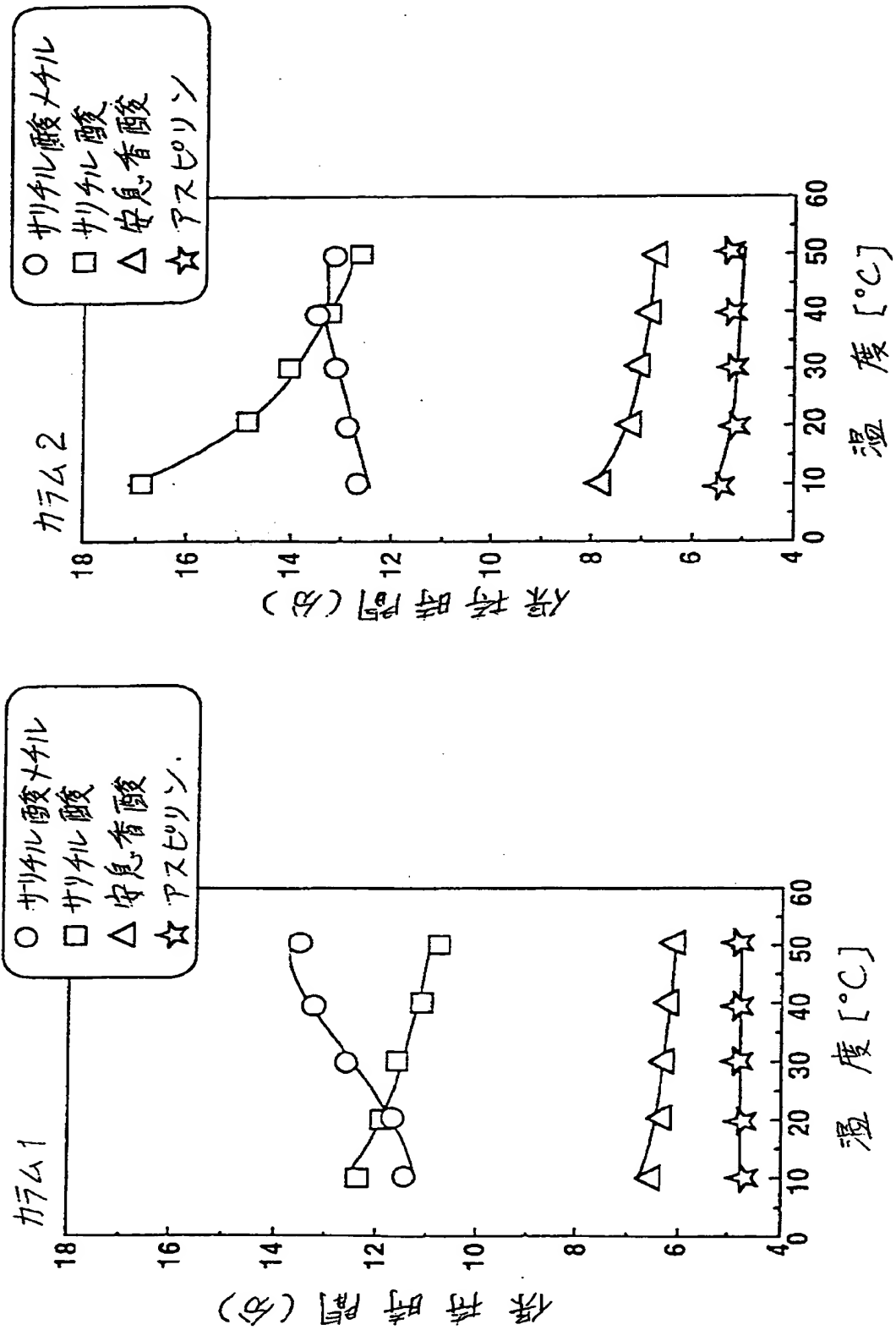
【図2】



【図 3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーそれぞれ単独では分離できない生体成分等をその活性を損なうことなく効率的に分離することができるクロマトグラフィー用充填剤を提供すること。

【解決手段】 移動相を水系に固定したままで、固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させることが可能である、荷電を有する共重合体を含む充填剤を用いる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 593064630

【住所又は居所】 千葉県市川市国府台 6-12-12

【氏名又は名称】 岡野 光夫

【代理人】 申請人

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【氏名又は名称】 社本 一夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【氏名又は名称】 富田 博行

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [593064630]

1. 変更年月日 1993年 3月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県市川市国府台6-12-12

氏 名 岡野 光夫

